

B203

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/12, C07K 14/47, A61K 38/17</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/03647</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>29. Januar 1998 (29.01.98)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE97/01535</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>18. Juli 1997 (18.07.97)</b>		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 196 29 095.3 18. Juli 1996 (18.07.96) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: GOLD, Ralf [DE/DE]; Neurologische Klinik und Poliklinik im Kopfklinikum, Josef-Schneider-Strasse 11, D-97080 Würzburg (DE), WEISHAUPP, Andreas [DE/DE]; Neurologische Klinik und Poliklinik im Kopfklinikum, Josef-Schneider-Strasse 11, D-97080 Würzburg (DE).			
(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).			
(54) Title: USE OF RECOMBINANT MYELIN PROTEIN FOR TREATING T-CELL-MEDIATED AUTOIMMUNE DISEASES OF THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM			
(54) Bezeichnung: REKOMBINANTER MYELIN PROTEIN ZUR BEHANDLUNG VON T-ZELL VERMITTELTEM AUTOIMMUNERKRANKUNGEN			
(57) Abstract			
The invention concerns the use of recombinant myelin protein for treating T-cell-mediated autoimmune diseases of the peripheral nervous system.			
(57) Zusammenfassung			
Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von rekombinantem Myelinprotein zur Behandlung von T-Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen des peripheren Nervensystems.			

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	R	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

REKOMBINANTER MYELIN PROTEIN ZUR BEHANDLUNG VON T-ZELL VERMITTELTN AUTOIMMUNERKRANKUNGEN

Die Erfindung betrifft die Verwendung von rekombinantem Myelinprotein zur Behandlung von T-Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen des peripheren Nervensystems.

5 Bisher werden Nervenerkrankungen autoimmuner Genese durch eine immunsuppressive oder immunmodulierende Therapie behandelt. Beispielsweise sind gewöhnliche Behandlungsmethoden die Gabe von Steroiden (z.B. Kortison), Immunglobulinen und Langzeitimmunsuppressiva (z.B. Azathioprin) oder die Durchführung von Plasmaphorese. Allerdings besteht bei diesen Maßnahmen der  
10 Nachteil vieler unerwünschter Nebenwirkungen, und der Erfolg ist oft unzureichend.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, eine Möglichkeit bereitzustellen, mit dem T-Zell vermittelte Autoimmunkrankheiten des peripheren  
15 Nervensystems erfolgreich und schonend behandelt werden können.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Verwendung von rekombinantem Myelinprotein gemäß Patentanspruch 1 bzw. 2. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

20 Von den Erfindern wurde herausgefunden, daß Autoimmun-B-Zell- und -T-Zell-Antworten, die gegen periphere Myelin-Komponenten gerichtet sind, eine wichtige Rolle bei der Pathogenese entzündlicher demyelinisierender Krankheiten des Nervensystems spielen. Bekannt sind diese Erkrankungen als Immunneuropathien des peripheren Nervensystems, z.B. chronisch entzündliche Polyneuritis, Guillain-Barré Syndrom, Vaskulitiden des peripheren Nervensystems und Nervenentzündungen bei Gammopathien.

- 2 -

Das Vorhandensein neuritogener Moleküle in Myelin wurde erstmals nachgewiesen durch die Induktion einer experimentellen Autoimmunneuritis (EAN) am Tiermodell, wo Nagetiere mit Homogenaten von peripherem Nervengewebe (Waksman et al., J. Exp. Med. 102, 213-235 (1955)) oder gereinigtem P2-  
5 Protein (Brostoff et al., Nature (New Biol.) 235, 210-217 (1972)) immunisiert wurden. Bei dieser Modellerkrankung des peripheren Nervensystems erfolgt eine Disregulation des Immunsystems und es werden autoaggressive T-Lymphozyten erzeugt, die spezifisch für Strukturproteine des Myelins des peripheren Nervensystems sind und zu einer Demyelinisierung und zu Entzündungen im peripheren  
10 Nervensystem führen. Diese Modellerkrankung steht stellvertretend für die vorgenannten Autoimmunerkrankungen des peripheren Nervensystems, bei denen auch eine erhöhte T-Zellzahl, Demyelinisierung und Nervenentzündungen auftreten.

15 Von den Erfindern wurde nun gefunden, daß diese T-Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen des peripheren Nervensystems durch Gabe von hohen Dosen des Autoantigens, d.h. durch hochdosierte Gabe von Myelinprotein, wieder rückgängig gemacht bzw. wenigstens verbessert werden können. Diese Therapie nennt sich Hoch-Dosis-Antigen-Therapie und führt zu einem schonenden Tod der  
20 T-Zellen (T-Zell-Apoptose), die letztendlich für die Auslösung und den Verlauf der Krankheit verantwortlich sind. Es hat sich dabei als besonders geeignet herausgestellt, die Hoch-Dosis-Antigen-Therapie schon in einem frühen Krankheitsstadium durchzuführen. Aber auch bei einem fortgeschrittenen Krankheitsbild lassen sich noch beachtliche Erfolge verbuchen. So hat es sich bewährt, bei der  
25 Ratte das Antigen (Myelinprotein) in Dosen von 100 bis 500 µg zu verabreichen. Beim Menschen müssen entsprechend des höheren Körpergewichts höhere Dosen angewandt werden, die der Fachmann leicht bestimmen kann. Besonders bevorzugt ist die intravenöse Injektion.

30 Als zu verabreichendes Autoantigen eignen sich alle bisher bekannten Myelinproteine, wie z.B. P0, periphere Myelinglykolipide (z.B. GM1), MBP, PLP, MOG, MAG, S-100 Protein und insbesondere P2. Erfindungsgemäß soll der Begriff

- 3 -

"Myelinprotein" so verstanden werden, daß darunter auch Gemische verschiedener Proteine, Proteinfragmente und Gemische von Proteinfragmenten fallen. Hervorzuheben ist, daß diese Proteine rekombinant hergestellt worden sein sollten, da es sehr teuer und aufwendig ist, die Proteine in ausreichender Menge aus natürlichem Myelin zu reinigen. Außerdem kann es bei Verwendung von gereinigtem Protein aus Rindernervenmyelin leicht zu Übertragung von BSE kommen. Hinzu kommt, daß sich beim Menschen die Reaktion auf gereinigtes Rinderprotein sehr stark von der auf humanes P2 unterscheidet, da zwischen der menschlichen Sequenz und der vom Rind einige Aminosäurenunterschiede bestehen. Deshalb wurde bisher für T-Zellversuche natürliches humanes P2 eingesetzt, da rekombinantes Protein noch nicht verfügbar war. Dieses konnte jedoch inzwischen hergestellt werden und es ist erfindungsgemäß besonders bevorzugt rekombinantes humanes P2-Protein zu verwenden. Die Sequenz und Isolierung dieses Proteins ist in "Weishaupt et al., J. of Neuroimmunology 63, 149-156 (1995)" beschrieben. Die in dieser Veröffentlichung gezeigte Sequenz ist in Abb. 4 wiedergegeben. Weitere rekombinante Myelinproteine sind in Oettinger et al., J. of Neuroimmunology 44, 157-163 (1993) beschrieben.

Die Erfindung wird nun weiter anhand der Abbildungen beschrieben, von denen 20 zeigen:

Abb. 1 A + B: Behandlung von EAN mit verschiedenen Dosen von rhP2

Abb. 2: Suppression einer Ratten-T-Zelllinie durch Gabe von Antigen 25 in hoher Dosierung

Abb. 3 A: Immunocytochemische Analyse der T-Zell Infiltration in rhP2-behandelte Ratten und rhP0-Kontroll-Tiere bei Vorliegen von EAN. Die Werte sind als mittlere Dichte von T-Zellen/mm<sup>2</sup> ± 30 Standardabweichung von 3 Tieren/Gruppe angegeben.

Abb. 3 B: T-Zell-Apoptose bei behandelten Tieren im Vergleich zu

- 4 -

spontaner T-Zell-Apoptose bei Kontrolltieren. Die Werte sind als mittlere Dichte von apoptotischen Zellen/mm<sup>2</sup> ± Standardabweichung von 3 Tieren/Gruppe angegeben.

5        Abb. 4:        Nukleotidsequenz und entsprechende Aminosäuresequenz des menschlichen rekombinanten (komplette Sequenz) und Rinder-P2-Proteins (nur die Aminosäurenaustausche sind angegeben). Eingeführte Restriktionsenzymeschnittstellen und Histidin-Schwanz Sequenzen sind unterstrichen.

10

Die Erfindung wird nun weiter anhand der Beispiele beschrieben:

#### BEISPIELE

15

Es wurden weibliche Lewis-Ratten (Alter: 6-8 Wochen; Gewicht: 125-160 g) verwendet.

20

Vollständiges menschliches P2-Protein (rhP2) und die extrazelluläre Domäne von menschlichem P0-Protein (rhP0) wurden wie in "Weishaupt et al., J. of Neuroimmunology 63, 149-156 (1995)" beschrieben in E. coli exprimiert und durch Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie gereinigt.

25

Neuritogene P2-spezifische T-Zelllinien G5 und G7 wurden wie in "Linington et al., J. Immunol. 133, 1946-1950 (1984)" beschrieben hergestellt.

#### BEISPIEL 1

30

In einem ersten Experiment erhielten mehrere Ratten zweimal täglich 500µg rhP2 bzw. 100 µg rhP2 intravenös für 7 Tage, wobei an Tag 0 8 x 10<sup>6</sup> aktivierte P2-spezifische T-Zellen mit übertragen wurden, die fähig sein sollten EAN auszulösen. Bei den Tieren traten aber bis zum Tag 24 (Versuchsende) keine Krankheitssymptome auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Ratten der Kontrollgruppe,

- 5 -

welche anstatt rhP2 Ovalbumin erhalten hatten, den typischen Krankheitsverlauf von EAN, wobei ein Maximum der Krankheit mit Paraplegie und Tetraparese an Tag 6 nach der T-Zellinjektion beobachtet wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1A gezeigt.

5

#### BEISPIEL 2

Die Ratten, denen  $8 \times 10^6$  P2-spezifische T-Zellen injiziert worden waren, wurden 3 Tage nach der T-Zell-Injektion in verschiedene Gruppen geteilt:

10

Gruppe 1 erhielt zweimal täglich 500  $\mu$ g rhP2,  
Gruppe 2 erhielt zweimal täglich 100  $\mu$ g rhPO,  
Gruppe 3 erhielt zweimal täglich 100  $\mu$ g rhP2,  
Gruppe 4 erhielt zweimal täglich 500  $\mu$ g Ovalbumin.

15

Ratten, die zweimal täglich mit entweder 500  $\mu$ g oder 100  $\mu$ g rhP2 (Gruppen 1 und 3) behandelt worden waren, entwickelten nur milde Krankheitssymptome mit einem Maximum an Tag 5 nach der Zellinjektion. Schon an Tag 6 begannen die Krankheitssymptome in den rhP2-behandelten Gruppen 1 und 3 abzunehmen. Da man P2-spezifische T-Zellen zur Auslösung von EAN injiziert hatte, konnte die Gabe von PO-Protein erwartungsgemäß keinen positiven Effekt ausgelösen. Die Ergebnisse sind in Abb. 1B gezeigt.

20

In der nachfolgenden Tabelle 1 ist gezeigt, daß die histologische Analyse des Ischiasnervs bei den Gruppen 2 und 4 (rhPO-Gruppe und Ovalbumin-Gruppe) eine starke Entzündungsreaktion mit starker Infiltration von T-Zellen und Makrophagen zeigte. Bei den mit rhP2 behandelten Gruppen 1 und 3 fanden sich nur wenige Infiltrate.

25  
30

- 6 -

Frühe Krankheit [Behandlung pro Tag]	Anzahl der Ratten	Dauer der Behandlung [Tage nach der Immunisierung]	Krankheitsgrad am Maximum	T-Zell-Infiltrate am Maximum [Mittelwert ± SD]	Makrophagen Infiltrate am Maximum Makrophagen/mm <sup>2</sup> [Mittelwert ± SD]
2x 500 µg Ovalbumin (ova)	2	1-7	7.75 ± 0.3	248.7 ± 21.5	113.2 ± 17.8
1x 100 µg rhP2 + 1x ova	2	1-7	0	21.5 ± 5.8*	13.1 ± 5.2*
2x 100 µg rhP2	2	1-7	0	13.7 ± 4.1*	9.2 ± 3.2*
1x 500 µg rhP2 + 1x ova	2	1-7	0	13.5 ± 4.8*	8.5 ± 2.8*
2x 500 µg rhP2	2	1-7	0	6.3 ± 2.7*	3.2 ± 2.2*
<b>Fortgeschrittenen</b>					
Krankheit [Behandlung pro Tag]					
2x 500 µg Ovalbumin	3	3-7	7.7 ± 0.2	258.7 ± 38.1	100.4 ± 38.8
2x 500 µg rhP0	3	3-7	7.75 ± 0.3	249.2 ± 26.7	95.7 ± 19.1
2x 100 µg rhP2	3	3-7	3.0 ± 0.5**	37.6 ± 12.2*	16.1 ± 7.2*
2x 500 µg rhP2	3	3-7	2.7 ± 0.8**	6.5 ± 2.8*	2.2 ± 1.7*

\* = p < 0.01 vs. Ovalbumin, \*\* p < 0.05 vs. Ovalbumin.

- 7 -

**BEISPIEL 3**

T-Zellen wurden mit ansteigenden Dosen von rhP2 oder dem neuritogenen P2-Peptid (Aminosäuren 53-78) inkubiert. Dazu wurden  $1,5 \times 10^4$  Responder-G5 oder G7 T-Zellen,  $7,5 \times 10^5$  bestrahlte (3000 rad) Thymozyten und verschiedene Konzentrationen von rhP2 oder dem neuritogenen P2-Peptid in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung in eine 96-Loch-Mikrotiter-Platte eingefüllt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit  $0,2 \mu\text{Ci}/\text{Vertiefung}$   $^3\text{H-dT}$  für 16 Stunden markiert und zu dem angezeigten Zeitpunkt geerntet. Die Zellen wurden auf einem Glasfaserfilterpapier gesammelt und die Radioaktivitätsverteilung ausgewertet.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 gezeigt. Daraus ist ersichtlich, daß die Proliferation der neuritogenen T-Zellen bei  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  des neuritogenen P2-Peptids und bei  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  des rhP2-Proteins maximal war und dann stetig mit höheren Konzentrationen fiel.

15

**Beispiel 4**

An Tag 3 oder 6 nach einer intravenösen Injektion von  $8 \times 10^6$  aktivierten P2-spezifischen T-Zellen erhielten Lewis-Ratten  $500 \mu\text{g}$  rhP2 oder  $500 \mu\text{g}$  des Kontrollantigens rhPO, was nach 12 Stunden wiederholt wurde. 6 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und der Ischiasnerv entnommen. Die histologische Analyse des Ischiasnervs von rhP2-Empfängern zeigte eine Reduktion der entzündlichen Infiltrate um ungefähr 30% verglichen mit den rhPO-Kontrollen. Morphologisch zeigten die T-Zellen typische Zeichen von Apoptose. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3 A + B zusammengefaßt.

25

## PATENTANSPRÜCHE

- 1) Verwendung von rekombinantem Myelinprotein oder Fragmenten davon  
5 zur Behandlung von T-Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen des peripheren Nervensystems.
- 2) Verwendung von rekombinantem Myelinprotein oder Fragmenten davon  
10 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von T-Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen des peripheren Nervensystems.
- 3) Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das  
15 Myelinprotein P2, P0, MBP, PLP, MOG, MAG oder S-100-Protein ist.
- 4) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,  
daß das Myelinprotein ein Gemisch verschiedener Proteine und/oder  
20 Fragmente ist.
- 5) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet,  
daß die T-Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen des peripheren Nervensystems chronisch-entzündliche Polyneuritis, Guillaine-Barré-Syndrom, Vaskulitiden im peripheren Nervensystem und Nervenentzündungen bei  
25 Gammopathien sind.
- 6) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,  
daß das rekombinante Myelinprotein in Form einer Hoch-Dosis-Antigen-Therapie eingesetzt wird.  
30

1/4

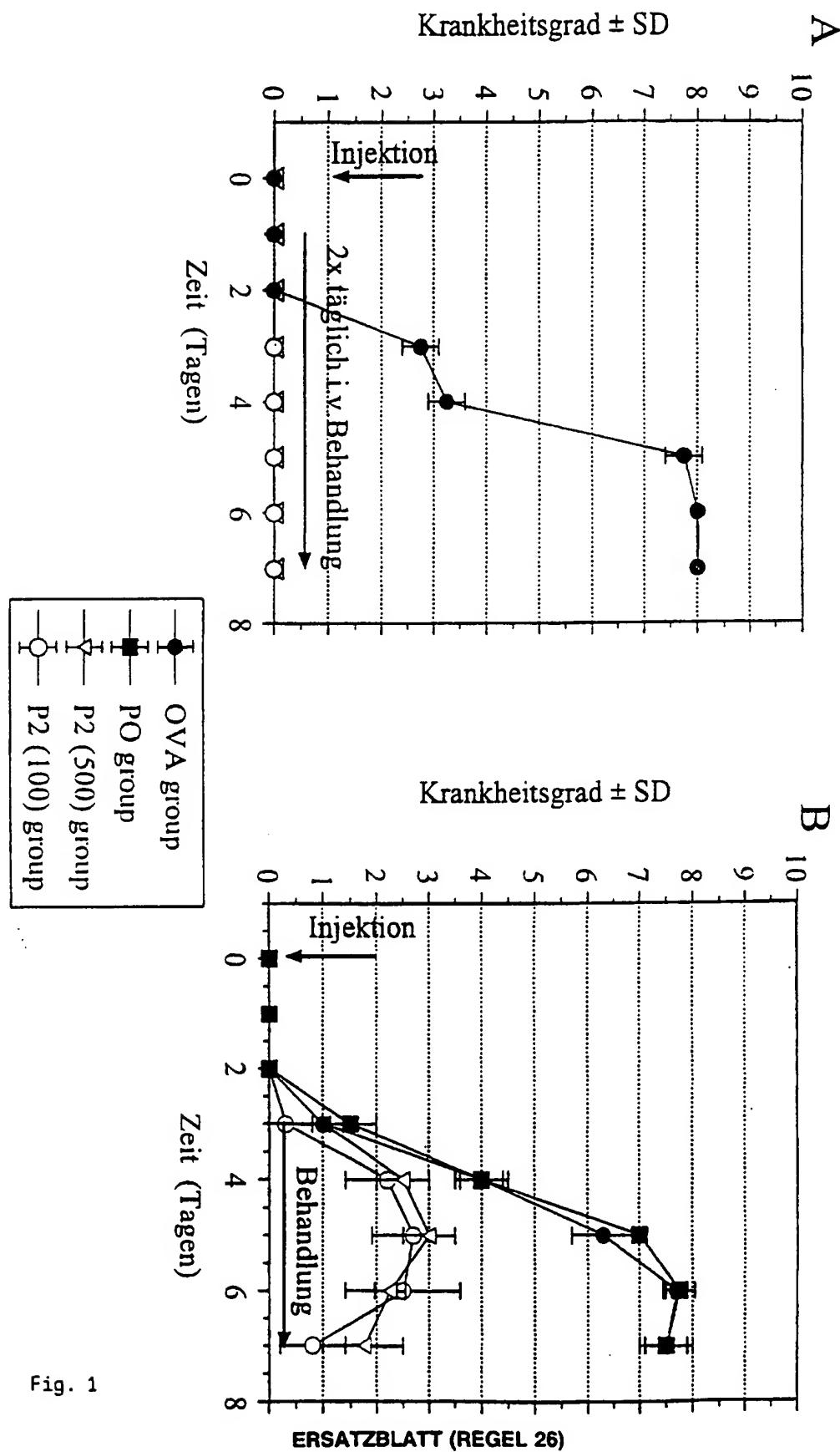


Fig. 1

2/4

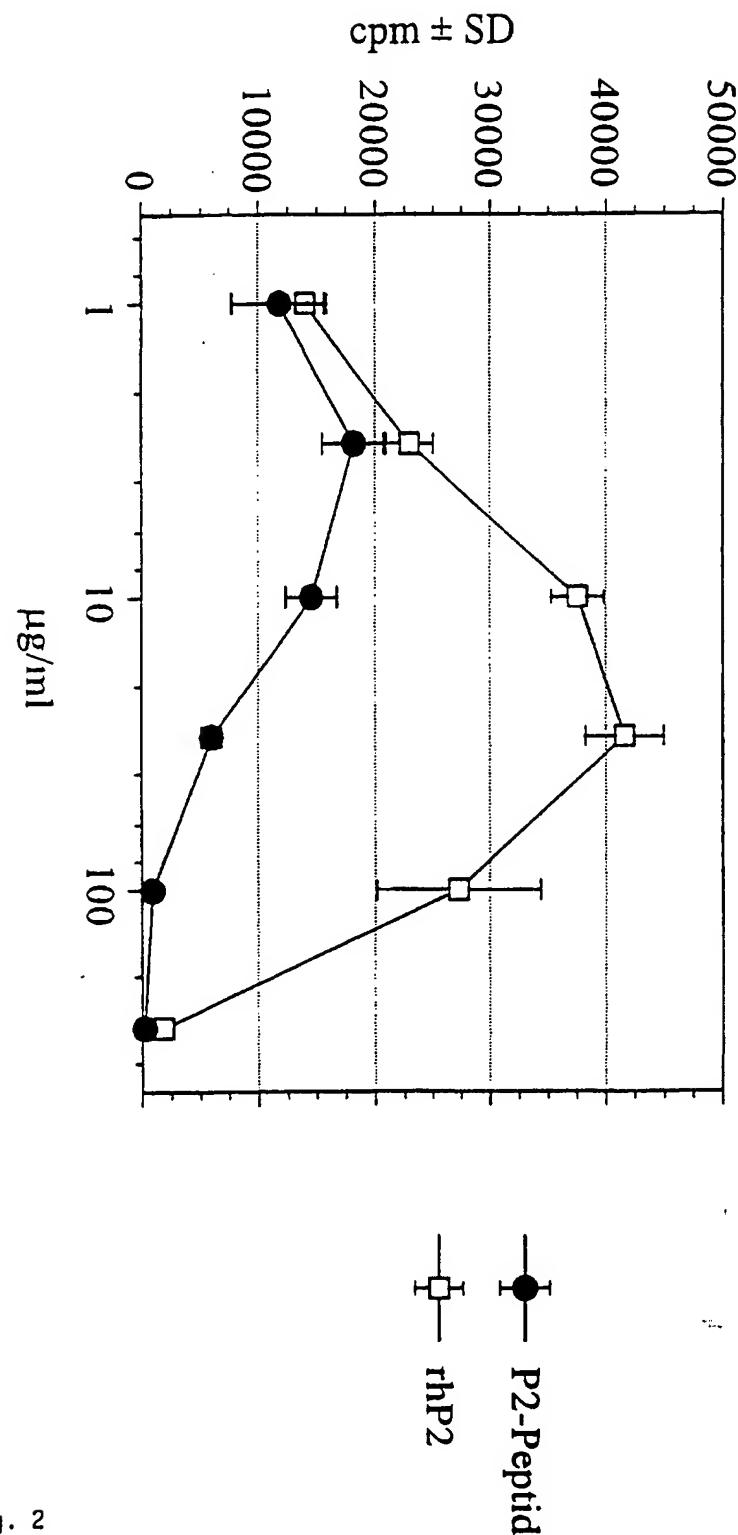


Fig. 2

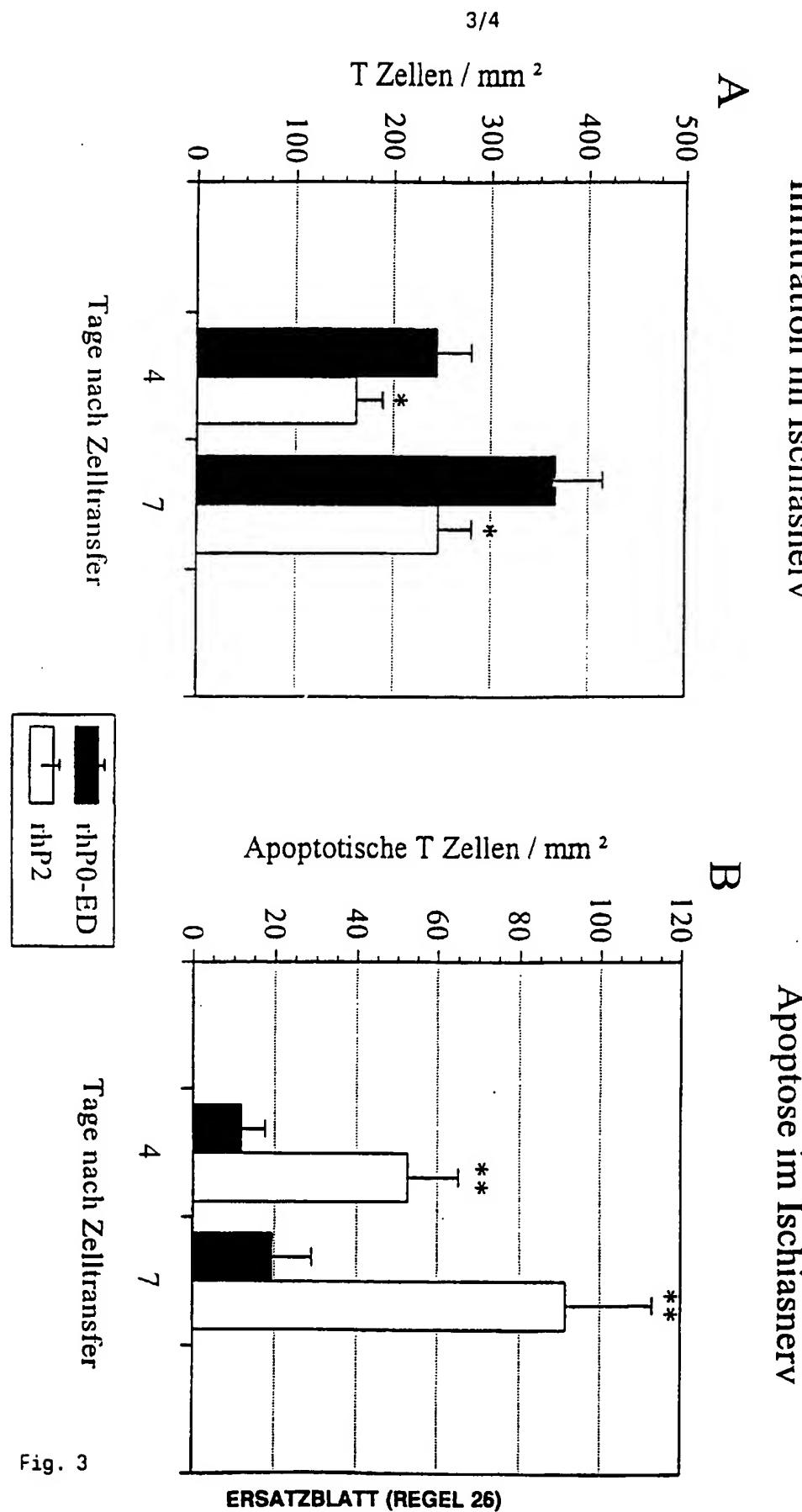


Fig. 3

4/4

1	M	S	N	K	F	L	G	T	W	K	L	V	S	S	E	N	16
1	ATG	AGC	AAC	AAA	TTC	CTG	GGC	ACC	TGG	AAA	CTT	GTC	TCT	AGC	GAG	AAC	48
	NdeI																
17	F	D	Y	M	K	A	L	G	V	G	L	A	T	R	K	32	
49	TTT	GAC	GAT	TAC	ATG	AAA	GCT	CTG	GGT	GTG	GGG	TTA	GCC	ACC	AGA	AAA	96
	P																
35	L	G	N	L	A	K	P	T	V	I	I	S	K	K	G	D	48
97	CTG	GGA	AAT	TTG	GCC	AAA	CCC	ACT	GTG	ATC	ATC	AGC	AAG	AAA	GGA	GAT	144
	P																
49	I	I	T	I	R	T	E	S	T	F	K	N	T	E	I	S	64
145	AAT	ATA	ACT	ATA	CGA	ACT	GAA	AGT	ACC	TTT	AAA	AAT	ACA	GAA	ATC	TCC	192
	A																
65	F	K	L	G	Q	E	F	E	E	T	T	A	D	N	R	K	80
193	TTC	AAG	CTA	GGC	CAG	GAA	TTT	GAA	GAA	ACC	ACA	GCT	GAC	AAT	AGA	AAG	240
	A																
81	T	K	S	I	V	T	L	Q	R	G	S	L	N	Q	V	Q	96
241	ACC	AAG	AGC	ATC	GTA	ACC	CTG	CAG	AGA	GGA	TCA	CTG	AAT	CAA	GTG	CAG	288
	K																
97	R	W	D	G	K	E	T	T	I	K	R	X	L	V	N	G	112
289	AGA	TGG	GAT	GGC	AAA	GAG	ACA	ACC	ATA	AAG	AGA	AAG	CTA	GTG	AAT	GGG	336
	K																
113	K	M	V	A	E	C	K	M	K	G	V	V	C	T	R	I	128
337	AAA	ATG	GTA	GGC	GAA	TGT	AAA	ATG	AAG	GGC	GTG	GTG	TGC	ACC	AGA	ATC	384
	D																
129	Y	D	V	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	*	136
385	TAT	GAC	GTC	CAT	CAT	CAC	408										
	AtIII																

Fig. 4